بسم الله الرحمن الرحيم

وَأَعِدُّوا لَهُمْ مَا اسْتَطَعْتُمْ مِنْ قُوَّةٍ وَمِنْ رِبَاطِ الْخَيْلِ تُرْهِبُونَ بِهِ عَدُوَّ اللَّهِ وَعَدُوَّكُمْ وَآخَرِينَ مِنْ دُونِهِمْ لَا تَعْلَمُونَهُمُ اللَّهُ يَعْلَمُهُمْ وَمَا
تُنْفِقُوا مِنْ شَيْءٍ فِي سَبِيلِ اللَّهِ يُوَفَّ إِلَيْكُمْ وَأَنْتُمْ لَا تُظْلَمُونَ



بسم الله والحمد لله والصلاة والسلام على رسول الله
الحمد لله نحمده ونستعينه ونستهديه ونستغفره ونعوذ بالله من شرور أنفسنا ومن سيئات أعمالنا
من يهده الله فهو المهتد ومن يضلل فلن تجد له وليا مرشدا

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا انك أنت العليم الحكيم
سبحانك لا فهم لنا إلا ما فهمتنا انك أنت الجواد الكريم

هذا شرح نظري لتحضير احد ا قوى السموم المعروفة في العالم والمصنف كأحد الأسلحة البيولوجية (أسلحة الدمار الشامل) ،وأقوى واخطر السموم في العالم وهو سم البوتيولزم(الجرام الواحد النقي يكفي لقتل مليون أدمي وهذه حقيقة علمية ولكن تتواجد صعوبات عملية في الوصول إلى مثل هذا النقاء ونشرة بصورة صحيحة) وهو من الأسلحة البيولوجية التي لا يتطلب تحضيرها مبالغ كبيرة أو تقنيات معقدة ولكن يكفى لاعدادة تقنيات معمل تحاليل طبية مضاف إليها بعض التجهيزات الإضافية لتحضيره في صورة مناسبة للاستخدام(حتى وان كانت الصورة النهائية له ليست عالية النقاء ولكنها تكون ذات فعالية كبيرة) والصورة النهائية للسم تكون على شكل بودرة يسهل تهريبها إلى اى مكان ومن ثم يتم إعادة إذابتها واستخدامها لكن التعامل مع هذا الشرح يحتاج إلى شخص ذو خلفية علمية (طالب أو خريج إحدى الكليات الآتية الطب –الصيدلة –الطب البيطري للزراعة للعلوم)ليتمكن من فهم محتوياته والتعامل معها وتعديلها إذا استدعى الأمر في حالة مواجهة مشاكل أثناء عملية التحضير حيث انه بحث نظري وحيث أن أي تطبيق عملي لنظرية ما قد يواجهه مشكلات قد تتطلب تعديلات في خطوات العمل وقد اعتمدت في تحضيره على دراسة خصائص السم النظرية وطرق تنقيته المختلفة وحاولت اختيار منها أسهلها وأكثرها فعالية وفى نفس الوقت اقلها تكلفة ولكن لم أتمكن من تطبيقها عمليا بسبب عدم توفر الإمكانيات

ملاحظات هامة: -

١ على الشخص الذي سيقوم بالعمل أن يقوم بمراجعة اى كتاب حول التعامل العملي مع الكائنات الدقيقة practical microbiology للاستزادة منه بخصوص بعض الخطوات العملية أو تنزيله من على الانترنت practical microbiology manual
حيث أن هذا السم تنتجه نوع من الكائنات الدقيقة لذا يجب أن يقوم بعمل مراجعة لهذا الجانب لتعلم كيفية التعامل معها

(فَلَمْ تَقْتُلُوهُمْ وَلَكِنَّ اللَّهَ قَتَلَهُمْ وَمَا رَمَيْتَ إِذْ رَمَيْتَ وَلَكِنَّ اللَّهَ رَمَى وَلِيُبْلِيَ الْمُؤْمِنِينَ مِنْهُ بَلَاءً حَسَنًا إِنَّ اللَّهَ سَمِيعٌ عَلِيمٌ)
والله من وراء القصد
وهو وحده الهادي إلى سواء السبيل

تحضير سم البوتيولزم (سم الطعام الفاسد)

مقدمة:.. -

سم البوتيولزم هو احد انواع السموم التي تحدث تأثيرها عن طريق العمل على الجهاز العصبي وتنتجه احد أنواع الكائنات الدقيقة (كلوستريد يم) بمختلف فصائلها وخصوصا الفصيلة(كلوستريديم بوتيولزم) والذي ينمو في أوساط الطعام الفاسد في بيئة لا هوائيه وهو مسئول عن اغلب حالات التسمم الغذائي الجماعي التي تحدث حول العالم سم البوتيولزم مسبب للوفاة بسبب إحداثه لشلل في الجهاز العصبي مما يؤدى إلى شلل في عضلات الرئة ومن ثم الموت

تكون الأصابه بسم البوتيولزم نتيجة إما لتسمم غذائي أو أن يحدث حالات تسمم للأطفال(يحدث بصورة غير متوقعة من حين لأخر بسبب تلوث المواد المكونة لغذاء الأطفال بهذا السم من الطبيعة) أو تسمم الجروح أو أن يكون تسمم غير معلوم المصدر

حالات التسمم بهذا السم أيضا يمكن أن تحدث نتيجة إضافته إلى مصادر الغذاء أو إطلاقه في الهواء في صورة رذاذ بسبب إمكانية تحضيره معمليا

في حالات التسمم البوتيولزم تكون أول خطوة لعلاج المصاب هي مساعدته على الحفاظ على التنفس عن طريق توصيل أنبوب تنفس موصل بجهاز تنفس صناعي ويجب إعطائه جرعات من مضاد السم(الترياق) في أسرع وقت ممكن حتى يتمكن المضاد من معادلة السم قبل ارتباطه بالخلايا العصبية حيث إنها هي الوسيلة الوحيدة الممكنة للعلاج وفى حالة تأخر إعطائه للمرضى المشكوك في إصابتهم بالسم (بسبب عدم وجود أعراض للمرض) فان ذلك يؤدى إلى الوفاة

يتكون هذا البحث من ستة فصول

١ للبحث عن البكتيريا المنتجة للسم وفصلها عن الكائنات الأخرى في صورة نقيه
٢ -التعرف على الظروف المطلوبة لإنتاج السم معمليا
٣ -فصل السم وتنقيته معمليا
٤ -قياس تركيز السم المنقى
٥ تخزين السم والحفاظ علي فاعليته من الضياع
٦ -كيفية استخدامه كسلاح بيولوجي

المعدات المطلوبة للعمل

١ -ثلاجة
٢ -أدوات مختبر تحاليل طبيه(أنابيب اختبار، اوانى زجاجيه(بيكر فلاسك) ، ....
٣ -فرن لتجفيف الأدوات بعد عملية التنظيف والتعقيم
٤ -جهاز تجفيف في درجات حرارة منخفضة (ليوفيلايزر).... يمكن استبداله بالجهاز رقم ١٩ حيث انه مرتفع التكلفة
٥ -وعاء لطحن المواد معقم

٦ -ملاقيط معقمه
٧ -سدادات قطنية معقمه للأنابيب
٨ -شفاطات سحب سوائل (يمنع منعا باتا استخدام الفم لشفط السوائل أثناء التحضير)
٩ -أنابيب لزراعة البكتيريا تكون ذات رأس حلزونية
١٠ - برطمانات محكمة الغلق (كبديل عن أكياس النيتروجين التي تحافظ على عدم وجود الأكسجين في الوسط المحيط) يمكن استبداله بصندوق زجاجي محكم الغلق توضع فيه شمعة مشتعلة تنطفئ عند انتهاء الأوكسجين الموجود فيه
١١ - أسلاك لنقل وزراعة البكتيريا
١٢ - جهاز انكيوبيتور(حضانة) للحفاظ على درجة حرارة مناسبة لنمو البكتيريا
١٣ - برطمانات معقمة لحفظ العينات
١٤ - حامل للأنابيب
١٥ - شرائح ميكروسكوب
١٦ - ميكروسكوب به خاصية phase-contrast أو bright-field
١٧ - أطباق بتري معقمة(تستخدم لزراعة الكائنات الدقيقة)
١٨ - أنابيب زجاجية وبلاستيكيه خاصة بالطرد المركزي تكون ذات نهايات ضيقة
١٩ - جهاز طرد مركزي مزود بمبرد وماكينة تفريغ للهواء
٢٠ - جهاز تحضير مياه مقطرة
٢١ - ماصات ميكانيكية مختلف الأحجام(يمكن استبدالها بسرنجات على أن يتم كسر الطرف المدبب لها) بالإضافة إلى سرنجات ذات أحجام صغيرة لحقن فئران التجارب
٢٢ - فئران تجارب يتراوح وزنها بين ١٦ ـ ٣٤ جم
٢٣ - أقفاص للفئران ووسائل إطعام
٢٤ - جهاز تعقيم (اوتوكلاف)
٢٥ - جهاز لقياس الأس الهيدروجيني (بى اتش ميتر)
٢٦ - حمام مائي(ساخن وثلجي)
٢٧ - ميزان اليكتروني
٢٨ - خلاط أو مضرب بيض
٢٩ - فريزر
٣٠ - جهاز تقليب سوائل باستخدام المغناطيس
٣٢ ثلاجة عرض للأجبان مثل التي تكون في محلات البقالين والتموينات

المواد المستخدمة في التنقية

فوسفات بفر أس هيدروجيني ٦ -٦،٢ -٧-
كحول ايثيلى ٧٠ %
ملح سلفات الامونيوم أو ملح طعام
محلول لصباغة العينات(صبغة جرام)
أشرطة مشبعة بمادة الميثيلين بلو
محلول لصباغة الحويصلات
محلول ملحي معقم

محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز واحد مولار أو هيدروكسيد صوديوم صلب
محلول حمض الكلوريك تركيز واحد مولار أو حمض كلوريك مركز
محلول فينول ريد تركيز ١ % مائي
مكونات أوساط النمو (وهى مذكورة في كل وسط)

احتياطات هامة: -

إن السم الذي سوف يتم تحضيره هو أقوى السموم المعروفة على الإطلاق حيث تكفى كمية دقيقة منة تصل إلى الجسم عن طريق الفم أو الأنف إلى الوفاة لذا يجب على من يقوم بتحضيره اتخاذ بعض الخطوات الاحتياطية الهامة وهى كالاتى: -

١ أحفظ اللـــه يحفظـــك :
عن ابن عباس رضي الله عنه قال : كنت خلف النبي صلى الله عليه وسلم يوماً ، فقال لي : (يا غلام ، إني أعلمك كلمات : أحفظ الله يحفظك ، أحفظ الله تجده تُجاهك ، إذا سألت فاسأل الله ، وإذا استعنت فاستعن بالله ، واعلم أن الأمة لو اجتمعت على أن ينفعوك بشيءٍ لم ينفعوك إلا بشيءٍ قد كتبه الله لك ، وإن اجتمعوا على أن يضروك بشيءٍ لم يضروك إلا بشيءٍ قد كتبه الله عليك ، رفعت الأقلام وجفت الصحف) رواه الترمذي وقال : حسن صحيح .

٢ -الإكثار من الأذكار مثل قول(بسم الله الذي لا يضر مع اسمه شيء في الأرض ولا في السماء وهو السميع العليم).. ثلاث مرات.. فمن قالها ثلاثاً حين يصبح وثلاثاً حين يمسي لم يضره شيء. ..وقراءة سورة الإخلاص والمعوذتين ثلاث مرات صباحاً ومساءاً فإنها تكفي العبد من كل شيء

والاستغفار قدر الإمكان قال تعالى : ((وَمَا أَصَابَكَ مِنْ سَيِّئَةٍ فَمِنْ نَفْسِكَ))

٣ للدعاء وطلب الهداية والإرشاد من الله عز وجل قال تعالى(ولا يحيطون بشئ من علمة إلا بما شاء) وقال تعالى(وَعَلَّمَ آدَمَ الْأَسْمَاءَ كُلَّهَا ثُمَّ عَرَضَهُمْ عَلَى الْمَلَائِكَةِ فَقَالَ أَنْبِئُونِي بِأَسْمَاءِ هَؤُلَاءِ إِنْ كُنتُمْ صَادِقِينَ(٣١) قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ)
٤ للأخذ بالأسباب قدر الإمكان وهى كالاتى -
يمنع الأكل والشرب تماما داخل المعمل
يجب ارتداء واقي انف وفم قفازات ونظارة وقاية طوال الوقت ويفضل ارتداء قناع واقي
للأدوات الزجاجية والبلاستيكية تغلي جيدا مع إضافة نسبة ١٠ % من محلول كلوروكس أو تعقم في الاوتوكلاف بعد استخدامها
للإبر تستخدم في اقل الحدود الممكنة(ويفضل كسر طرف الإبر الغير مستخدمة في الحقن)
تؤخذ جرعة من المضاد للسم كل أسبوعين(وهو متوفر في مراكز الأمصال في معظم البلاد)
غسل كل الأسطح بعد الانتهاء بمحلول مطهر يحتوى على نسبة ١٠ % كلوروكس
للحيوانات الميتة تدفن على عمق كبير مع الجير الحي إن أمكن

كل الماء الناتج من التجارب والأوساط المستخدمة بعد الانتهاء منها يتم تعقيمها في الاوتوكلاف اوتغلى جيدا مع إضافة نسبة ١٠ % من محلول كلوروكس قبل التخلص منها
-يمنع استخدام الفم في عمليات شفط السوائل
تكون هناك ملابس خاصة لدخول المعمل تخلع عند الخروج منه
تسجيل البيانات والتجارب أولا بأول حتى لا يحدث خلط بين النتائج
يفضل أن يكون المعمل في منطقة بعيدة عن السكان حتى إذا ما حدث تسرب للبكتيريا فلا تؤدى إلى انتقالها إلى السكان(هي غير معدية لهم ولكن قد تنموا على الطعام مما قد يؤدى إلى أضرار وحالات تسمم)

ملاحظة هامه : -

لإجراء الأبحاث على هذا السم في المعامل الطبية يجب ان يكون هذا المعمل مجهزا بتجهيزات خاصة للوقاية تجعله فيما يطلق عليه اسم المستوى الثالث من مستويات الحماية ولكن لتعذر عمل ذلك بالتكاليف البسيطة يجب اخذ الحذر قدر الامكان

خصائص السم وملاحظات عامة: -

*بكتيريا الكلوستريديم بوتيولزم هي بكتيريا لا هوائية(وجود الهواء يؤدى إلى قتل البكتيريا وعدم نموها) موجبة الاستجابة لصبغة جرام
مكونة لحويصلات(تتكون تلك الحويصلات قرب نهاية خلية الكلوستريديم محدثة انتفاخ في الخلية) ذات شكل عصوى ولديها القدرة على التحرك(ملاحظة هامه هي أن معظم فصائل جنس الباسيلس تكون متحركة هي الأخرى حتى لا يختلط الأمر حول تلك الخاصية) تنتمي إلى جنس الباسيلس(بعض أنواع البكتيريا المنتمية إلى هذا الجنس لا تكون حويصلات)
هناك نوع من البكتيريا (كلوستريديم بريفرينوجين وهو المسئول عن تعفن الجروح وتكوين الغنغرينه)وهو من جنس الباسيلس أيضا مشابه للكلوستريديم بوتيولزم غير انه يحدث تحللا لكرات الدم الحمراء الموجودة في وسط (blood agar) أثناء النمو كما أن خلاياه تكون مرتبة في صورة أزواج (لا يحدث هذا مع الكلوستريديم بوتيولزم)

هناك عدة أنواع من بكتيريا الكلوستريديم بوتيولزم (A-B-C-D-E-F-G) كل نوع له صفاته الخاصة وينتج نوعا مختلفا من السم ولكل نوع مضاد للسم(ترياق) مختلف عن الأخر
النوع (A) من البكتيريا هو الأكثر انتشار في التربة الغير مستصلحة في حين النوع (B) هو الأكثر انتشارا في التربة المستصلحة
حويصلات النوعين A-B تكون مقاومة للحرارة في حين في حين حويصلات النوع E تكون حساسة لدرجات الحرارة المرتفعة

بكتيريا ا كلوستريديم بوتيولزم تنمو في أوساط الطعام ذات الأس الهيدروجيني أعلى من ٦و ٤ في حالة كان فرق جهد التأكسد الخاص بالطعام منخفضا كما في حالة لحوم الدجاج -اللانشون -الكبد -الأسماك المدخنة

كل الزرعات الخاصة بالنوع A وبعض الزر عات الخاصة بالنوعين F - B تسبب تحللا للبروتينات الموجودة في وسط(بياض البيض المتخثر) (egg yolk medium) أو (وسط مدعم بجزيئات لحم) في حين أن

النوعين D – C وبعض الزرعات الخاصة بالنوعين F - B لا يسببان مثل هذا التحلل تستخدم تلك الطريقة للتعرف على النوعين A-B حيث أن السم الذي ينتجه هذان النوعان هما الأكثر فاعليه مقارنة بالأنواع الأخرى

أفضل درجة حرارة تتكون عندها الحويصلات هي ٣٧ ْ لمدة ٧ ـ ٨ أيام

يكون السم متركزا داخل الخلية البكتيرية نفسها ويتحرر منها نتيجة لتحطم البكتيريا أو تحللها
بعض خصائص السم : -

١ ـ**حساس لارتفاع درجة الحرارة (يفقد فاعليته إذا تعرض لدرجة حرارة ٨٠ ْ لمدة ١٠ دقائق**

٢ ـ**يفقد فاعليته إذا تعرض للهواء مدة أكثر من ١٢ ساعة أو إذا تعرض للأحماض كم انه حساس للضوء لذا تتم جميع خطوات التنقية في أوعية زجاجية ذات لون داكن وتكون الزرعات الخاصة بالبكتيريا محفوظة في الظلام**

٣ ـ**السم عبارة عن بروتين يحتوى على عنصر الزنك ويتكون من جزأين وتركيبه مشابه لتركيب سم التيتانوس**

٤ ـ**١ جم من كريستالات السم النقية تكفى لقتل مليون شخص إذا ما تم نشرها بصورة صحيحة ومناسبة ولكن هناك العديد من الصعوبات العملية التي تعترض هذا التنفيذ (الجرعة القاتلة من السم من نوع A = 0,001 مجم/لكل كجم من وزن الجسم=١ ميكروجرام/كجم**

٥ ـ**الجزيئان المكونان للسم نوع A احدهما يبلغ ٩٧ kd ويتكون من ٨٣٢ حمض امينى و الأخرى ٥٣ kd ويتكون من ٤٤٨ حمض امينى ويرتبط الجزأين معا برابطة كبريت**

٦ ـ**تبدأ ظهور أعراض التسمم بعد التعرض للسم عن طريق الاستنشاق بفترة من ٢٤ إلى ٣٦ ساعة وتكون الأعراض الأولى للتسمم صداع قلق زيادة إفراز اللعاب قيئ عدم وضوح الرؤية الآم في الأطراف إخراج لا ارادى تأثيرات على الجهاز العصبي المركزي تؤدى إلى تشوش الرؤية جفاف الحلق ـشلل تنازلي (من أعلى الجسم إلى الأسفل) ـتوقف التنفس ثم الوفاة**

٧ ـ **لا يوجد تطعيم ممتد المفعول للوقاية من هذا السم(نشرت بعض الأبحاث إمكانية تطعيم الآدميين ضد البوتيولزم عن طريق إعطاء ثلاث جرعات من الترياق على فترات ولكن معظم الأبحاث نفت وجود مصل واقي له) ولكن المتوفر هو مضاد السم (الترياق) وهو مفيد فقط لوقاية المرضى الذين تعرضوا للسم قبل ظهور الأعراض عليهم أو لأولئك الذين يتوقع تعرضهم للسم ولكن إذا ظهرت أعراض التسمم على المريض فانه يكون بدون فائدة وفى تلك الحالة لا يتواجد له علاج سوى إدخال المريض إلى العناية المركزة لفترة طويلة(٣ أشهر) وإمداده بأجهزة تنفس صناعي مع إعطائه جرعات مستمرة من الترياق كمحاولة لوقف تدهور الحالة**

٨ ـ**سم البوتيولزم سم يعمل على الجهاز العصبي حيث يهاجم نقاط الاشتباك الخاصة بالأعصاب محدثا توقف في إنتاج الاسيتيل كولين**
الموصل العصبي فائق الأهمية للجسم ويؤدى ذلك إلى الشلل

٩ ـ**سم البوتيولزم لا يخترق الجلد السليم للإنسان (إلا في حالة وجود موصل أو موسع لمسام الجلد)**

١٠ ـ **في حالة إطلاق السم في صورة رذاذ فانه يصعب التعرف علية في عينات الدم أو البراز ولكن يمكن التعرف عليه خلال ٢٤ ساعة من التعرض له في عينات مخاط الأنف**

١١ ـ **الترياق المضاد لسم البوتيولزم هو عبارة عن أجسام مضادة له من نوع (Ig I antibodies) وهو متواجد إما كترياق لنوع واحد من السم فقط (النوع A مثلا أو B مثلا) أو لنوعين من السم معا (A,B) أو للسبع أنواع من السم مع بعضهم البعض septavalent وهذا يتواجد في مراكز الأبحاث الكبرى أو التابعة للقوات المسلحة**

١٢ - في حالة إطلاق السم في صورة رذاذ فأن تواجده في مكان الإطلاق يعتمد على حجم الجزيئات المطلقة (كلما صغر حجمها كلما زاد انتشارها وارتفعت فاعليتها) كما أن ثبات فاعليته بعد الإطلاق يعتمد على الظروف المناخية مثل درجة الحرارة ونسبة الرطوبة حيث تؤثر هذه العوامل على فاعلية السم وتفقده فاعليته بمعدل يتراوح من ١ ٤ % في دقيقة الواحدة فمثلا بمعدل ١ % فان السم يفقد تأثيره بعد يومين من أطلاقة (بفرض أن الجزيئات كانت ذات حجم مناسب حتى لا تترسب من الجو بسرعة)

١٣ - نمو بكتيريا الكلوستريديم في الأوساط يكون مصحوبا بحدوث تعكر للوسط بالإضافة إلى انخفاض معامل الأس الهيدروجيني فيه إلى حوالي ٦و٥ (يضاف إلى الوسط عادة مادة الفينول ريد التي يتغير لونها في حالة انخفاض الأس الهيدروجيني للوسط) ⟵تغير لون الوسط إلى الأحمر

١٤ - الصورة التي ينتجها النوع E من السم صورة خاملة لا تكتسب فاعلية إلا بعد تعرضها للتحلل بأنزيم التريبسين(هذا الإنزيم متواجد في الجهاز الهضمي للإنسان)

١٥ - فترة الحضانة المطلوبة لإنتاج اكبر تركيز من سم البوتيولزم هي خمسة أيام ويمكن الكشف عنه في اليوم الثالث

الفصل الأول: -

البحث عن بكتيريا كلوستريديوم بوتيولزم (النوعين A , B) وفصلهم : -

في الخطوات التالية سنقوم بعزل هذان النوعان من الكلوستريديوم (حيث أنهما ينتجان أقوى نوعان من السم من بين الأنواع السبعة)

يتم التعامل مع العديد والعديد من عينات التربة من مختلف المصادر (تربة من بحيرات من ارض مستصلحة من ارض بور فضلات حيوانات) يفضل أن تكون هذه العينات من على عمق كبير من سطح التربة ٣٠ سم مثلا

غالبا ما تحتوى هذه العينات من التربة على العديد والعديد من حويصلات الكائنات الدقيقة اللاهوائية الأخرى ولذا تعتبر هذه الخطوة أصعب وأطول واهم الخطوات

التعرف على السم يكون عن طريق حقن الفئران بعينات من الترب المزروعة وملاحظة النتائج على كل على حدة ومقارنتها بالتأثيرات النظرية لتسمم البوتيولزم على الحيوانات

قبل بداية عملية الفصل يجب عمل صدمة حرارية لعينات التربة المستخدمة (رفع درجة الحرارة إلى ٨٠ درجة لمدة ١٠ دقائق في مياه مقطرة)

أول وسط يستخدم لزراعة البكتيريا يكون داعما لنمو البكتيريا اللا هوائية وهو إما
(brucella BAP-modified cooked meat
medium MCMM broth - chopped liver broth - TPGY broth سوف يتم شرح طريقة تحضير كل وسط على حدة في حينه

الخطوات: -

١ ـضع عشرة جرامات من عينات مختلفة من التربة(كل على حدة) في وعاء(بيكر) زجاجي قم بإضافة ٢٥ مل من الماء المقطر وضعها على حمام ماء ساخن لمدة ١٠ دقائق في درجة حرارة ٨٠ درجة(يتم قياس درجة الحرارة باستخدام ترمومتر)

٢ ـقم بتقليب المعلق المتكون ومن كل وعاء(بيكر) قم بإضافة ١ مل من المعلق إلى أنبوبة من الوسط **(brucella BAP** أو **modified cooked meat medium MCMM broth** أو **chopped liver broth** أو **TPGY broth)**

قم بوضع الأنابيب في درجة حرارة ٣٥ درجة لمدة ٥ أيام

٣ بعد خمسة أيام قم بفحص الأنابيب كل على حدة ولا حظ <u>تكون عكارة في الوسط</u> او<u>تغير في لون الوسط</u> نتيجة لتغير الأس الهيدروجيني أو <u>تكون غاز</u> (يبدأ تكون الغاز بعد ١٢ ـ ١٨ ساعة من الزراعة) أو <u>اختفاء حبيبات اللحم الموجودة في الوسط</u> (يقوم الكلوستيريديوم بإحداث تغيير ايجابي في كل الملاحظات السابقة)

٤ ـفي حالة عدم حدوث نمو بعد ٥ أيام في الوسط خذ ١٠ % من الأنابيب وقم بإعادة زراعتها في وسط جديد لمدة ٥ أيام أخرى (قد تكون هناك عوامل أدت إلى إصابة الحويصلات مما أدى إلى بطء نموها)

تحضير الأوساط: -

ملاحظة هامة بعدـتحضير الوسط يجب عمل إزالة للأكسجين المذاب في الوسط عن طريق وضعة فوق حمام مائي معرضا للبخار الناتج منه لمدة١٥ دقيقة ثم عمل تبريد سريع للوسط بدون تقليب قبل زرع العينة مباشرة كما يجب أن تحفظ الأطباق في صندوق لا هوائي قبل الزراعة

<u>Chopped liver</u>

يتكون هذا الوسط من جزأين يحضر كل منهما على حدة

الجزء الأول

Fresh beef liver	**500 g**	قطع كبد طازجة
Peptone	**10 g**	بودرة بيبتون
K_2HPO_4	**1 g**	فوسفات ثنائي البوتاسيوم
Soluble starch	**1 g**	نشا
Distilled water	**1 liter**	ماء مقطر

يتم فرم قطع الكبد جيدا جدا وتغلي في ماء لمدة ساعة تبرد يتم قياس الأس الهيدروجيني عن طريق البى اتش ميتر أو أشرطة قياس الأس الهيدروجيني ويتم ضبط الأس الهيدروجيني عند معيار ٧ عن طريق إضافة قطرات من محاليل ا مولار حمض الهيدروكلوريك و ١ مولار هيدروكسيد الصوديوم (الحمض يقلل الأس الهيدروجينى وهيدروكسيد الصوديوم يرفعه)

قم بغلي الكبد لمدة ١٠ دقائق أخرى ثم فلتره في قطعة من القماش لإزالة السوائل الموجودة فيه قدر الإمكان قم بإضافة المكونات الأخرى ثم أضف الماء لتحضير ١ لتر ثم اضبط الأس الهيدروجيني عند ٧ مرة أخرى(عند ضبط الأس الهيدروجيني يسمح بزيادة أو نقص طفيفة في حدود

٢و٠
خذ ٥و١ جم من العجينة الأولى وأضفها إلى ٥و١٨ مل من المخفف وضعهم في جهاز التعقيم لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة ١٢١

المخفف (الجزء الثاني)

Tryptone	10 g	بودرة تريبتون
Sodium thioglycollate	1 g	صوديوم ثيوجليكوليت
Soluble starch	1 g	نشا
Dextrose	2 g	دكستروز
phenol red (1% aqueous)	5 ml	فينول ريد محلول مائي نسبة ١ %
Distilled water	1 liter	ماء مقطر

توضع المكونات مع بعضها البعض يتم ضبط الأس الهيدروجيني عند ٨و٦ يسمح بزيادة أو نقص طفيفة في حدود ٢و٠

Modified cooked meat medium broth: -

يتكون هذا الوسط أيضا من جزأين

الجزء الأول

Cooked meat medium

يتواجد في صورة جاهزة في الأسواق ولكن يمكن تحضيره كما يلي

Beef heart	454 g	لحم قلب بقر
Protease peptone	20 g	بودرة بروتييز بيبتون
Dextrose	2 g	دكستروز
NaCl	5 g	صوديوم كلورايد

تتبع نفس الخطوات المتبعة مع الوسط السابق ولكن مع استبدال الكبد بلحم قلب البقر وبدون إضافة الماء وأيضا يتم تحضير مخفف بنفس النسب السابقة

ويتم الخلط بنفس النسب باستخدام نفس طريقة التحضير

٥ -بعد اكتمال النمو خذ ١ -٢ مل من الوسط وضعهم في كحول نقى (١٠٠ %) في أنبوبة ذات غطاء واتركهم في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة أو ضع ١ -٢ مل من الوسط في إناء وقم بتسخينهم في حمام مائي (٨٠ درجة لمدة ١٠ -١٥ دقيقة) لقتل الخلايا الحية وتحفيز الحويصلات على النمو في الوسط التالي(الطريقة الثانية أفضل وأسهل)

٦ -قم بإضافة نقطة أو نقطتان من العينة التي تم تسخينها إلى ١٠ مل محلول ملحي معقم قم بعمل تخفيف متسلسل ٣ مرات(من أل ١٠ مل محلول الملح خذ ١ مل أضفه إلى ٩ مل محلول ملحي أخر ثم من المحلول الجديد خذ ١ مل أضفه إلى ٩ مل آخرين ثم خذ منه ١ مل أضفه إلى ٩ مل محلول ملحي ثالث) من المحلول الثالث خذ نقطه أو نقطتين باستخدام سلك زراعة وقم بزراعتهم بطريقة التخطيط على وسط [nutrient gelatin]أو [Liver-veal-egg yolk agar]أو[anaerobic egg yolk agar] وضعه في الحضانة عند درجة ٣٥ درجة لمدة ٥ أيام في ظروف لا هوائية (عن طريق ملء الطبق بماء مقطر ووضعه في الصندوق الزجاجي الذي توضع فيه الشمعة -أو عن طريق تغطية الأطباق المزروعة بطبقة من الفازلين المعقم)(يتم استخدام شرائط مشبعة بمادة المثيلين بلو التي تتخذ اللون الأزرق في حالة وجود الأوكسجين ويختفي هذا اللون خلال ساعتين في حالة انعدامه) بعد ٥ أيام تقوم المستعمرات الميكروبية التي تحلل البروتينات بإحداث منطقة شفافة حولها في الطبق ومن هذه المستعمرات)

تركيب الأوساط

Nutrient Gelatin

Infusion broth	25 g	انفيوشن بروث
Gelatin	120 g	جلاتين
Distilled water	1 liter	ماء مقطر

قم بإضافة المكونات إلى بعضها قم بتسخينها مع التقليب حتى يتم ذوبان المكونات الصلبة قم بالتبريد حتى درجة حرارة ٥٥ درجة واضبط الأس الهيدروجيني عند معامل ٤و ٧ يسمح بزيادة أو نقصان ٢و ٠
قم بصب الوسط في أنابيب ذات غطاء وعقمها في المعقم عند درجة حرارة ١٢١ لمدة ١٥ دقيقة ثم قم بصبها في الأطباق

Liver-Veal Agar

Liver, infusion	50 g	منقوع كبد	Starch,	10 g	نشا

from			soluble		
Veal, infusion from	500 g	منقوع لحم عجل	Casein, isoelectric	2 g	كازيين
Protease peptone	20 g	بروتيوز بيبتون	NaCl	5 g	صوديوم كلورايد
Neopeptone	1.3 g	نيو بيبتون	Sodium nitrate	2 g	نترات صوديوم
Tryptone	1.3 g	تريبتون	Gelatin	20 g	جلاتين
Dextrose	5 g	دكستروز	Agar	15 g	أجار
Distilled water		ماء مقطر		1 liter	

قم بإضافة المكونات إلى بعضها مع التسخين والتقليب حتى يتم ذوبان المكونات
قم بصب الوسط في أنابيب ذات غطاء وعقمها في المعقم عند درجة حرارة١٢١ لمدة ١٥ دقيقة ثم قم بصبها في الأطباق
واضبط الأس الهيدروجيني عند معامل٣و٧ يسمح بزيادة أو نقصان ٢و٠

Liver-Veal-Egg Yolk Agar

Fresh eggs, yolks only	2 or 3	بيض طازج(المحاء فقط)
Liver veal agar	48.5 g	الوسط السابق تحضيره
Distilled water	500 ml	ماء مقطر

كيفية تحضير محاء البيض للاستخدام
قم بغسل بيضتين طازجتين جيدا ثم قم بغمرهم في كحول ايثيلى تركيز ٧٠ % لمدة ساعة قم بكسر البيضة في ظروف معقمة (في منطقة ما حول اللهب للهب المعمل) استخرج المحاء ثم قم بإضافته إلى كمية مماثله لحجمه من محلول ملحي معقم ثم قم بتقليبه

قم بالتسخين مع التقليب حتى تذوب المكونات قم بالتعقيم لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ١٢١ درجة ثم برد إلى درجة ٥٠ استعدادا لصبه

Egg yolk emulsion

أضف ٤٠ مل من محاء البيض المعلق في محلول ملحي معقم إلى ٥٠٠ مل من **liver veal agar** السائل ثم قم بصبه في أطباق الزراعة قم بتجفيف الأطباق بتركها في درجة حرارة الغرفة لمدة يومين أو بوضعها في الحضانة عند درجة حرارة ٣٥ لمدة يوم واحد تأكد من خلو الأطباق من الزرعات الغير مرغوبة ثم قم بتخزينها في الفريزر (درجة حرارة ٤)

Anaerobic Egg Yolk Agar

الجزء الأول

-Agar base

Yeast extract	5 g	مستخلص الخميرة
Tryptone	5 g	تريبتون
Proteose peptone	20 g	بروتيوز بيبتون
NaCl	5 g	صوديوم كلورا يد
Agar	20 g	أجار
Distilled water	1 liter	ماء مقطر

قم بإضافة المكونات إلى بعضها مع التسخين والتقليب حتى يتم ذوبان المكونات
قم بصب الوسط في أنابيب ذات غطاء وعقمها في المعقم عند درجة حرارة١٢١ لمدة ١٥ دقيقة
واضبط الأس الهيدروجيني عند معامل٧ يسمح بزيادة أو نقصان ٠،٢
تحضير الوسط: -
قم بخفض درجة حرارة الجزء الأول إلى ثم أضف ٨٠ مل من محلول البيض مع محلول الملح المعقم ثم قم بصب الأطباق بسرعة قم بتجفيف الطباق لمدة يومين في درجة حرارة الغرفة أو لمدة يوم في الحضانة عند درجة حرارة ٣٥ تأكد من خلو الأطباق من الزر عات الغير مرغوبة ثم قم بتخزينها في الفريزر (درجة حرارة ٤)

٧ لاختيار المستعمرات التي يشتبه أن تكون للكلوستريديم بوتيولزم
قم باختيار عشر مستعمرات مفصولة جيدا من المستعمرات التي أحدثت تحللا للبروتينات سواء على وسط الجيلاتين أو الوسط المحتوى على محاء البيض قد تكون هذه المستعمرات مسطحه أو مقببة ملساء أو محببة (غالبا ما تكون حواف المستعمرة غير منتظمة) ويفضل أن تكون المستعمرات المنتقاة ذات لون اسود(منتجة للسلفايد)
أثناء النمو على وسط يحتوى على محاء البيض فان مستعمرات الكلوستريديم غالبا تتخذ سطحا مكونا لألوان قوس قزح إذا ما تعرض للضوء العادي

ملاحظة هامة هي أن ليست كل المستعمرات التي نمت على الأوساط هي مستعمرات للكلوستريديوم بوتيولزم حيث أن هناك الكثير من أفراد عائلة الكلوستريديوم تكون لها خصائص مظهرية مشابهة غير أنها لا تنتج السم لذا فان إنتاج السم سيكون هو المعرف الرئيسي لنا لتحديد اى تلك المستعمرات هو المطلوب

بعد اختيار المستعمرات قم بأخذ مسحة من كل على حدة وافحصها تحت الميكروسكوب وازرع المستعمرة في أنبوب يحتوى على وسط **chopped liver broth** أو **cooked meat medium**

ثم قم بوضعها في الحضانة لمدة ٥ أيام كما هو موضح من قبل

٨ -بعد ٥ أيام قم بعمل اختبار لتحديد وجود السم في الأوساط عن طريق فئران التجارب
قم بعمل طرد مركزي للأنبوب عند سرعة ٢٢٠٠ لمدة ٢٠ دقيقة خذ الطبقة العليا وأضف إليه محلول فوسفات بفر أس هيدروجيني ٢و٦ بنسبة ٢:١ ثم قم بحقن الفأر في البطن بكمية ٢و٠ مل من الخليط ولاحظ الفأر لمدة ٣ -٦ أيام أو اقل للتعرف على علامات التسمم البوتيوليزمى في حالة حدوثها وهى
ارتعاش الفراء بطء التنفس ضعف في الأطراف يؤدى إلى شلل تام مع الوقت اللهاث سقوط الفك السفلى ثم الموت نتيجة لتوقف الجهاز التنفسي
ملاحظة سم التيتانوس الذي تنتجةاحدى أفراد هذه العائلة أيضا يسبب أعراض مشابهه(في هذه الحالة يتم التأكد عن طريق الفحص الميكروسكوبي
وفاة الفأر بدون ظهور هذه العلامات لا يعنى تواجد السم(قد يكون السبب هو وجود كائنات أخرى في العينة أدت إلى الوفاة

تحضير فوسفات بفر أس هيدروجيني ٧

قم بإذابة نصف جرام من دايصوديوم هيدروجين اورثوفوسفات لا مائي و ٣و٠ جم من بوتاسيوم داى هيدروجين اورثو فوسفات في كمية ماء لتكوين ١٠٠٠ مل يحفظ في درجة حرارة ٤ درجة

تحضير فوسفات بفر أس هيدروجيني ٦

قم بإذابة ٨و٦ جم من صوديوم داى هيدروجين اورثو فوسفات في كمية من الماء لتكوين ١٠٠٠ مل وقم بضبط الأس الهيدروجيني باستخدام قطرات من محلول ١٠ مولار صوديوم هيدروكسيد
أو
اضف ٥و٢٨ مل من ٢و٠ مولار محلول هيدروكسيد الصوديوم إلى ٢٥٠ مل من ٢و٠ بوتاسيوم داى هيدروجين اورثو فوسفات ثم أضف الماء حتى يبلغ حجم المحلول ١٠٠٠ مل

تحضير جيلا تين فوسفات بفر أس هيدروجيني ٢و٦

Gelatin	2 g	جيلا تين
Na_2HPO_4	4 g	داى صوديوم هيدروجين اورثو فوسفات
Distilled water	1 liter	ماء مقطر

قم بإضافة المكونات إلى بعضها مع التسخين البسيط لإذابة المكونات الصلبة ثم عقم في درجة ١٢١ لمدة ٢٠ دقيقة

فصل البكتيريا الكولستريديوم بوتيولزم

بعد تحديد أي الأنابيب التي أظهرت أعراض التسمم البوتيولزمى على الفئران قم بإعادة زراعة عينه من تلك الأنبوب في طبقين على احد الأوساط
nutrient agar أو **egg yolk agar medium** ---------- قم باستحضان احدهما في ظروف هوائية والأخر في ظروف لا هوائية عند درجة ٣٥ لمدة ٥ أيام نمو البكتيريا في الظروف اللا هوائية وعدم نموها في الظروف الهوائية دلالة أخرى على نقاء العينة من البكتيريا الأخرى عدا الكوليستريديوم

ملاحظه المطلوب هو فصل إحدى نوعى الكوليستريديوم B - A لذا فان خاصية تحلل البروتين والجيلاتين في وسط النمو هامه جدا للتعرف عليهما

إذا تعذر فصل البكتيريا بعد كل تلك الخطوات فان هذا يدل على أن تركيزها في العينة الأولى كان قليلا لذا يجب تكرار عملية الزراعة في الأوساط قبل عملية الفصل(تأخذ من الوسط القديم ١ مل تضيفه إلى ٩ مل من الوسط الجديد ثم بعد النمو تأخذ ١ مل تضيفه إلى ٩ مل من وسط جديد) قبل الخطوة رقم ٥

يجب أيضا أن يتم العمل على العديد من عينات التربة لضمان فصل البكتيريا بأذن الله

يتم الاعتماد أيضا على الخصائص الميكروسكوبية للتعرف على الكولستريديوم و هى
موجبة الاستجابة لصبغة جرام
مكونة لحويصلات(تتكون تلك الحويصلات قرب نهاية خلية الكلوستريديم محدثة انتفاخ في الخلية)
ذات شكل عصوي
لديها القدرة على التحرك

تحضير مخزون من الحويصلات للاستخدام

لا بد من الاحتفاظ بمخزون من البكتيريا في صورة متحوصلة لاستخدامها في بدء الزراعة
كلما زاد عدد الحويصلات المزروعة في الوسط زادت نسبة السم المتكون
الخطوات: -

١ قم باختيار مستعمرة مفصولة من الكوليستريديوم (بعد التعرف عليها) وازرعها في وسط **cooked meat medium** لمدة ثلاثة أيام
في ظروف لا هوائية ثم لمدة يومين في ظروف هوائية (لتحفيز تكوين الحويصلات) بعد ذلك قم بتسخينها في حمام مائي ٨٠ درجة لمدة ١٠ دقائق
٢ اخفض درجة الحرارة إلى ٣٥ ـ ٤٠
٣ خذ ١٠ % من الوسط المزروع وأضفه إلى وسط جديد **(brain-heart-infusion)** – أو **cooked meat medium**

طريقة التحضير

Brain-heart-infusion

Calf brain, infusion from	200 g	كالف برين انفيوشن (مخ عجل)
Beef heart, infusion from	250 g	بيف هارت انفيوشن (قلب بقر)
Proteose peptone (Difco) or polypeptone (Bioquest)	10 g	بروتيوز بيبتون أو بوليبيبتون
NaCl	5 g	صوديوم كلورايد
Na_2HPO_4*	2.5 g	داى صوديوم هيدروجين اورثو فوسفات
Dextrose	2.0 g	دكستروز
Distilled water	1 liter	ماء مقطر

قم بإذابة المكونات في الماء وسخن مع التقليب
الطريقة الثانية

Brain heart-infusion	6.0 g	بيف هارت انفيوشن (قلب بقر)
Peptic digest of animal tissue	6.0 g	أنسجة حيوانية معالجة
NaCl	5.0 g	صوديوم كلورايد
Dextrose	3.0 g	دكستروز
Pancreatic digest of gelatin	14.5 g	جيلا تين معالج إنزيميا

Na_2HPO_4	2.5 g	داى صوديوم هيدروجين اورثو فوسفات
Distilled water	1 liter	ماء مقطر

قم بإذابة المكونات في الماء واغل لمدة دقيقة لإكمال الذوبان

يمكن أن تحضر الوسط بأي الطريقتين

قم بصب الوسط في أنابيب ذات غطاء وعقمها في المعقم عند درجة حرارة ١٢١ لمدة ١٥ دقيقة
واضبط الأس الهيدروجيني عند معامل ٤و٧ يسمح بزيادة أو نقصان ٢، ٠

4-بعد الإضافة ضع الوسط الجديد في الحضانة لمدة ٢٤ ٤٨ ساعة في درجة حرارة ٣٢ في ظروف لا هوائية وفى الظلام

٥ خذ ٢ مل من الخطوة ٤ وضعها في أنبوبة جديدة تحتوى على اى الوسطين وضعها في الحضانة لمدة ٢٤ ساعة في ظروف لا هوائية وفى الظلام

٦ خذ ١٥ مل من الخطوة ٥ وضعها في وعاء(بيكر) ١٥٥ مل ممتلئ بالوسط وضعه في الحضانة لمدة ٢٤ ساعة في ظروف لا هوائية وفى الظلام

٧ خذ ٥٠ مل من الخطوة ٦ وضعها في وعاء(بيكر) ٤٥٠ مل ممتلئ بالوسط وضعه في الحضانة لمدة ٢٤ ساعة في ظروف لا هوائية وفى الظلام

بالنسبة لأوساط النمو التي تكون في أوعية كبيرة يفضل عمل تقليب لها كل ٦ ساعات حتى تحتفظ بتركيبة الوسط كما هي في الوسط كله

٨ خذ ٢٠ مل من الخطوة ٧ وضعهم أنبوبة وضعهم في الحضانة لمدة ٧ أيام (بعد سبع أيام قم بفحص عينه تحت الميكروسكوب فإذا كانت نسبة الحويصلات في العينة من ٣٥ ـ ٥٠ % ننتقل إلى الخطوة التالية إذا كانت اقل تترك يوما أخر

٩ قم بقتل الخلايا الحية الموجودة في الوسط إما عن طريق التسخين أو ترك الوسط في الهواء لمدة يومين

١٠ قم بعملية فصل بالطرد المركزي عند سرعة ٢٢٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة

١١ ـاستخرج الراسب واغسله بمحلول ١مج\مل ليزوزيم أو ماء مقطر بارد ثم اغسله مرتان بعد ذلك باستخدام الماء أو فوسفات بفر ٧

بعد كل غسيل قم بفصل الحويصلات باستخدام الطرد المركزي عند سرعة ٢٢٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة

١٢ لحفظ الحويصلات بعد فصلها ضعها في ماء مقطر أو فوسفات بفر وأحفظها في درجة حرارة ٢ ٣

الفصل الثاني

الظروف المؤثرةعلى إنتاج السم: -

هناك العديد من العوامل التي تؤثر سواء على نمو البكتيريا أو إنتاج السم أو كلاهما هذه العوامل مثل معامل الأس الهيدروجيني درجة الحرارة
تركيب الوسط ونوع البكتيريا

تركيب الوسط

في حالة إضافة ١و٠ إلى ١ جزء من المليون من مادة لينوليك أسيد يؤدى ذلك إلى اضطراب غشاء خلايا البكتيريا وعدم تماسكه ويزداد خروج السم المتركز داخل الخلايا)

بالنسبة للأوساط السابقة بعض الأوساط يفضل استخدامها لإنتاج السم البعض الأخر يفضل استخدامها لإنتاج الحويصلات(يختلف حسب

نوع البكتيريا نفسها) لذا يفضل أن تتم زراعة نفس نوع البكتيريا على أوساط مختلفة واختيار المناسب منها لإنتاج السم

درجة الحرارة

درجة الحرارة المثلى لنمو البكتيريا وتكوين السم للنوعين B A هو من ٣٢ -٣٧ درجة (أيضا هي درجة الحرارة المناسبة لتكوين الحويصلات

معامل الأس الهيدروجيني

إن معامل الأس الهيدروجيني الخاص بالوسط يجب أن يضبط بدقة قدر الإمكان حيث أن اى زيادة أو نقصان سوف تؤثر على نمو البكتيريا وتكوين السم

مع ازدياد نمو البكتيريا فان معامل الأس الهيدروجيني الخاص بالوسط سوف ينخفض

زراعة البكتيريا

قم باختيار أفضل وسط ينتج السم (يتم اختياره على أساس التجربة والمشاهدة للنتائج) أو استخدم **cooked meat medium** كل الزرعات يجب أن تحفظ في الظلام أثناء فترة الحضانة وفي ظروف لا هوائية(تملأ الأنبوبة إلى الفوهة بالوسط ولا يترك فراغ للهواء ثم تغلق بإحكام أو عن طريق وضع طبقة من الفازلين المعقم فوق إطباق الزراعة أو ملء الأطباق بالماء المقطر بعد الزراعة

يفضل أن يحتوى الوسط على مادة **Na thioglycoate** _التي تمتص الأوكسجين من الوسط

١ من مخزون الحويصلات المحضر سابقا خذ كمية مناسبة(حوالى٢و٠ جم) وازرعهم في **cooked meat medium broth** في أنبوبة اختبار وضعهم في الحضانة عند درجة ٣٢ -٣٦ درجة لمدة ٢٤ ساعة حتى حدوث بداية للنمو

٢ خذ ٢مل من الوسط الأول وازرعهم في أنبوب يحتوى على وسط جديد وضعه في الحضانة لمدة ٢٤ ساعة

٣ خذ ١٥ مل من الأنبوب ٢ وضعه في وعاء(بيكر) ١٥٥ مل يحتوى على وسط جديد وضعه في الحضانة لمدة ٢٤ ساعة

٤ خذ ثلاث كميات من الخطوة ٣ كل منها حجمها ٥٠ مل وضع كل واحدة في وعاء(بيكر) ٤٥٠ مل يحتوى على وسط جديد وضعه في الحضانة لمدة خمسة أيام بعدها خذ ٢٠ مل من كل وسط وأخلطهم سويا وابدأ خطوات التنقية عليه(هذا هو الجزء الأول) واحتفظ بباقي الأوساط في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ درجة

ملاحظة : -الجزْ الأول هو الذي ينفذ عليه خطوات التنقية أولا ومن ثم يتم تحديد التركيزات وتفاصيل الخطوات الخاصة بالتنقية ومن وتطبيقها على باقي الكمية

نتائج الاختبار على الفئران تستغرق ١ -٤ يوما لمعرفتها

لا تحفظ الأوساط المتبقية مجمدة ولكن في درجة ٤

الفصل الثالث

فصل السم وتنقيته

كل خطوات التنقية يجب أن تتم في درجة حرارة من صفر الى ٤ درجة منعا لتحلل السم بواسطة الإنزيمات الموجودة في داخل الخلية ويجب أن تنفذ بأسرع وقت ممكن(يفضل أن تتم كل الخطوات التالية داخل ثلاجة مثل ثلاجات عرض الاجبان الموجودة في محلات البقالة وتكون مفروشة بطبقة من الثلج وتكون مغلقة قدر الإمكان للحفاظ على درجة الحرارة داخلها وبعيدا عن الضوء)

١ تحطيم الخلايا البكتيرية

تنفذ هذه الخطوة من اجل استخراج السم الموجود داخل الخلايا البكتيرية هناك العديد والعديد من الوسائل التي يمكن استخدامها لتكسير الخلايا(كيميائية أو ميكانيكية) واختيار الوسيلة المناسبة يعتمد على بعض العوامل مثل حجم العينة التي يتم العمل عليها ونوع الخلايا

أفضل هذه الوسائل هو استخدام BEAD MILL HOMOGENIZERS ويمكن استبداله بمضرب بيض أو خلاط قوى

بعد انتهاء عملية التحطيم تفحص الخلايا تحت الميكروسكوب للتأكد من تحطمها

الخطوات: -

١ خذ الجزء الأول وقم بعمل فصل بالطرد المركزي عند سرعة ٢٢٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة خذ الراسب (الخلايا)ثم ضعه في أنبوب يحتوى على فوسفات بفر معامل ٧ وأضف إلى المعلق سلفات الامونيوم بتركيز ٢و٠ مولار من اجل تثبيت المحلول(٠٣و٠ جم / مل) واحتفظ به عند درجة حرارة ٤ درجات

٢ لحضر الخلاط وضع الوعاء(بيكر) الخاص به الذي توضع فيه المواد في الفريزر قبل وضع المحلول المحتوى على الخلايا فيه

٣ -احضر وعاء(بيكر) من الزجاج المعالج بالسيلكون(المستخدم في التجارب المعملية) واطحنه طحنا جيدا جدا(يجب أن يكون حجم الجزيئات حوالي ١و٠ ملليمتر) ثم انقع الزجاج المطحون لمدة ١٦ ساعة في محلول مركز من حمض الهيدروكلوريك ثم اغسلهم بماء مقطر حتى يصبح الأس الهيدروجيني للماء المغسول به ٧ بعد ذلك ضع جزيئات الزجاج في الفرن عند درجة ١٥٠ لمدة ١٦ ساعة ثم ضعهم في الفريزر

٤ - أضف جزيئات الزجاج إلى المحلول بنسبة ٥٠ %من كمية المحلول وضعهم في الخلاط

٥ -قم بخفقهم جيدا لمدة ٥ -١٠ دقائق مع الحفاظ على درجة الحرارة عند ٤ درجات (هام جدا)

٦ -اترك الزجاج حتى يترسب ثم قم بفلترة الخليط

٧ -اغسل الجزيئات الزجاجية بمحلول فوسفات بفر (كمية صغيرة) ثم أضف المحلول إلى المحلول المصفى

٨ -خذ المحلول الناتج وافصل الخلايا المحطمة بالطرد المركزي عند سرعة ٤٥٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة مع الحفاظ على درجة الحرارة عند ٤

٩ -احتفظ بالمحلول الناتج عند درجة حرارة ٤ للخطوات التالية

ملاحظه هامة

في خطوات التنقية للسم يفضل أن يضاف محلول مثبط لعمل الإنزيمات المحللة للسم الموجودة داخل الخلية هذا المحلول صعب التحضير و بحاجة إلى مواد خاصة قد لا تتوفر في الأسواق لذا فان هذا المحلول يستبدل بأداء كل الخطوات في درجة حرارة منخفضة وفى اقل مدة ممكنه

طريقة تحضير المحلول المثبط

١ ـتحضير مخزون من المحلول المثبط

2.1. Method 1: Stock Inhibitor Solutions

1. PMSF stock solution: 0.2*M* in dry methanol or propanol. Dissolve 38 mg (*M* = 174.2) of PMSF in 1.0 mL of solvent. PMSF is toxic! Weigh this compound in a fume hood, and wear disposable gloves and a mask. Store at –20°C.
2. 3,4-DCI stock solution: 10 m*M* in DMSO. Dissolve 2.2 mg (*M* = 215) of 3,4-DCI in 1.0 mL of DMSO. Store at –20°C.
3. Iodoacetic acid stock solution: 200 m*M* in water. Dissolve 42 mg (*M* = 207.9) of sodium iodoacetate in 1.0 mL of water. Use immediately.
4. E64-c stock solution: 5 m*M* in water. Dissolve 1.8 mg of E64-c (*M* = 357.4) in 1.0 mL water. Store at –20°C.
5. 1,10 phenanthroline stock solution: 100 m*M* in methanol. Dissolve 19.8 mg 1,10 phenanthroline (*M* = 198.2) in 1.0 mL of methanol. Store tightly capped at room temperature or 4°C.
6. EDTA stock solution: 0.5*M* in water. Dissolve 18.6 g EDTA (disodium salt, dihydrate, *M* = 372.2) into 70 mL water, titrate to pH 7.0 or 8.5, and make up to 100 mL. Stable at room temperature or 4°C.
7. Pepstatin stock solution: 10 m*M* in DMSO. Dissolve 6.9 mg pepstatin (*M* = 685.9) in 1.0 mL of DMSO. Store at –20°C.

تحضير المحلول المثبط للاستخدام

3.1. Method 1: Working Inhibitor Cocktails

1. From the stock solutions described in Section 2.1., make a working inhibitor cocktail in water (not buffer, since some buffer compounds accelerate decomposition of the inhibitors). For 1.0 mL of working solution, and for each class of proteinases, proceed as follows:
   a. Serine: 200 µL PMSF (20 m*M* final) or 200 µL 3,4-DCI (2 m*M* final);
   b. Cysteine: 200 µL iodoacetate (40 m*M* final) or 200 µL E64c (1 m*M* final);
   c. Metallo: 100 µL 1,10 phenanthroline (10 m*M* final) or 100 µL EDTA (50 m*M* final); and optionally
   d. Aspartic: 100 µL pepstatin (1 m*M* final).

   Make up the final volume to 1.0 mL with water.
2. Use the working cocktail within 1 h of preparation. Dilute this by 20-fold into the sample (*see* Notes 1 and 2).

Pmsf= phenyl methyl sulfonyl fluoride فينيل ميثيل سلفونيل فلورايد
DCI= dichloroisocoumarine داى كلورو ايزو كومارين
E 64= epoxide inhibitor ايبوكسيد انهيبيتور

أو يمكن تحضير محلول مثبط آخر من
١٠٠ ملليمولار من فينيل ميثيل سلفونيل فلورايد في ايزوبروبانول
١ مج/مل ليوبيبتين في ماء
١ مج /مل بيبستاتين في ميثانول

٢ -مرحلة التنقية الأولى بواسطة الترسيب بسلفات الامونيوم في وسط ذو أس هيدروجيني ٧
تعتمد عملية الترسيب باستخدام الأملاح على مبدأ أن إضافة الأملاح إلى محلول يحتوى على خلائط بروتينية يؤدى إلى ترسب البروتينات بالتدريج من المحلول حسب كمية الملح المضاف
أكثر هذه الأملاح شيوعا هو سلفات الامونيوم
يجب تحديد ما هو تركيز الملح المطلوب لترسيب السم دونا عن البروتينات الأخرى الموجودة في المحلول(تحتوى الخلية على العديد والعديد من البروتينات الأخرى متواجدة مع بعضها البعض) ويتم هذا التحديد عن طريق إجراء التجارب الآتية على الجزء الأول من الوسط ثم بعد معرفة التركيز المطلوب يتم العمل على الوسط كله

الخطوات: -
من المحلول الناتج بعد الفصل بالطرد المركزي خذ ٢٥ مل وقسمة إلى ٥ أجزاء متساوية ٥ مل لكل منها وضعهم في أوعية زجاجية صغيرة
٢ ضع كل وعاء(بيكر) في إناء ثلجي أثناء خطوات العمل
في الوعاء(بيكر) ١ ضع ١٠٦و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل ١مل
في الوعاء(بيكر) ٢ ضع ٢٢٦و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل ١مل
في الوعاء(بيكر) ٣ ضع ٣٦١و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل ١مل
في الوعاء(بيكر) ٤ ضع ٥١٦و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل ١مل
في الوعاء(بيكر) ٥ ضع ٦٩٧و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل ١مل

عندئذ تكون نسبة سلفات الامونيوم في الأوعية هي على الترتيب ٢٠ % -٤٠ % -٦٠ %٨٠ % -١٠٠ %
إضافة سلفات الامونيوم يكون بكميات صغيرة مع التقليب (باستخدام جهاز تقليب مغناطيسي) ولا تضع كمية جديدة حتى تذوب الكمية الأولى
يجب أن يكون ملح سلفات الامونيوم مطحون طحنا جيدا
٣ لترك الأوعية لمدة ساعة للترسيب
٤ افصل الراسب بواسطة الطرد المركزي عند سرعة ٥٠٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة في درجة حرارة ٤
٥ خذ المحلول الرائق من كل وعاء(بيكر) وضعه في أنبوبه ثم خذ من كل محلول ١و٠ مل و أضفه إلى ٩و٠ مل محلول ملح بارد
٦ -من كل أنبوبة من السابق خذ ١و٠ مل وأضفه إلى ٩و٠ مل محلول ملح بارد

٧ خذ ٢و٠ مل من الأنبوبة الأخيرة واحقنها في فأر داخل البطن وراقب الفئران المحقونة لمدة ٢٤ ساعة وقارن بين سرعة الوفاة للفئران

٨ كلما ظهرت الأعراض على الفأر بسرعة   هذا معناه زيادة نسبة السم في المحلول   انخفاض نسبة السم في الراسب

٩ حدد التركيز من سلفات الامونيوم الذي يؤدى إلى ترسيب اكبر كمية من السم   اقل كمية من السم في المحلول   أبطأ وفاة للفأر أو عدم الوفاة على الإطلاق

مثال

إذا كان وقت ظهور الأعراض والوفاة للفئران في الأوعية الخمسة هو كالاتى

تركيز ٢٠ %   ١٢ ساعة----------

تركيز ٤٠ %   ١٣ ساعة----------

تركيز ٦٠ %   ٣٠ ساعة أو لا أعراض

تركيز ٨٠ %   -------   لا أعراض---

فهذا معناه أن السم قد ترسب عندما وصل التركيز إلى ٦٠ % اى انه يبدأ فى الترسب عند تركيز ٥٠ % إذا ففي أثناء ترسيب السم من الوسط كاملا يتم ترسيبه عند تركيز ٥٠ % من سلفات الامونيوم فتبدأ بالتركيز ٤٠ % ثم تزيد التركيز حتى يصل إلى ٦٠ % مع فصل الراسب المتكون (تتم حساب الكمية المطلوب إضافتها من سلفات الامونيوم لزيادة التركيز من الجدول التالي

Amounts of Solid Ammonium Sulfate Required to Change the Concentration of a Solution from a Given Starting Value to a Desired Target Value at 0°C

Initial percentage saturation at 0°C	Target percentage saturation at 0°C[a]																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

[a] g of solid ammonium sulfate/L of solution.

الكمية المطلوب إضافتها لرفع تركيز سلفات الامونيوم في المحلول من ٤٠ % إلى ٦٠ % تساوى ١٢٠ جم للتر

مرحلة التنقية الثانية باستخدام الترسيب بسلفات الامونيوم عند نقطة تساوى فرق الجهد (ايزو ايلكتريك بوينت)

نقطة تساو ى فرق الجهد هي معامل الأس الهيدروجيني الذ ى يكون فيه البروتين غير حامل لأى من الشحنات الكهربائية لا السالبة ولا الموجبة وعند هذه النقطة فان قابلية البروتين للترسيب تكون أعلى قابلية تعتبر هذه الطريقة أسهل طرق التنقية (أسهل من التنقية عن طريق الفصل الكروماتوجرافى)

الخطوات

الراسب المتكون من خطوة الفصل السابقة(تكون كميته اصغر بكثير من الحالة الأولى) يتم إعادة تعليقه في ١٠ مل فوسفات بفر أس هيدروجيني ٦او ٥و ٥ (معامل الأس الهيدروجيني ٦ هو نقطة تساو ى فرق الجهد النظرية لسم البوتيولزم النو ع A)

٢ -ضع الوعاء(بيكر) في الثلج أضف إليه ٦ ١٠٦و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل مل(يصبح تركيز سلفات الامونيوم ٢٠ %) وقم بالتقليب حتى يذوب اتركه في وعاء الثلج لمدة ثلاثين دقيقه ثم افصل الراسب بواسطة الطرد المركزي لترسب البروتينات الغير مرغوب فيها

٣ -انقل المحلول إلى وعاء جديد خذ منه ١و ٠ مل وقم بتخفيفه(كما في التجربة السابقة) واختبر وجود السم فيه عن طريق حقن جزء منه في فأر(وليكن هذا هو المحلول أ)

٤ -إلى باقي المحلول أضف ١١٣و٠ جم من سلفات الامونيوم لكل مل(يصبح تركيز سلفات الامونيوم ٤٠ %) وقم بالتقليب حتى يذوب اتركه في اناء الثلج لمدة ثلاثين دقيقه ثم افصل الراسب بواسطة الطرد المركزي لترسب البروتينات الغير مرغوب فيها

٥ -انقل المحلول إلى وعاء جديد خذ منه ١و ٠ مل وقم بتخفيفه(كما في التجربة السابقة) واختبر وجود السم فيه عن طريق حقن جزء منه في فأر(وليكن هذا هو المحلول ب)

٦ -إلى باقي المحلول اضف ١٢و ٠ جم من سلفات الامونيوم لكل مل(يصبح تركيز سلفات الامونيوم ٦٠ %) وقم بالتقليب حتى يذوب اتركه في اناء الثلج لمدة ثلاثين دقيقه ثم افصل الراسب بواسطة الطرد المركزي لترسب البروتينات الغير مرغوب فيها

٧ -انقل المحلول إلى وعاء جديد خذ منه ١و ٠ مل وقم بتخفيفه(كما في التجربة السابقة) واختبر وجود السم فيه عن طريق حقن جزء منه في فأر(وليكن هذا هو المحلول ج)

٨ إلى باقي المحلول اضف ١٦و ٠ جم من سلفات الامونيوم لكل مل(يصبح تركيز سلفات الامونيوم ٨٠ %) وقم بالتقليب حتى يذوب اتركه في اناء الثلج لمدة ثلاثين دقيقه ثم افصل الراسب بواسطة الطرد المركزي لترسب البروتينات الغير مرغوب فيها

٩ -انقل المحلول إلى وعاء جديد خذ منه ١و ٠ مل وقم بتخفيفه(كما في التجربة السابقة) واختبر وجود السم فيه عن طريق حقن جزء منه في فأر(وليكن هذا هو المحلول د)

١٠ -باقي المحلول اضف ١٧٤و ٠ جم من سلفات الامونيوم لكل مل(يصبح تركيز سلفات الامونيوم ١٠٠ %) وقم بالتقليب حتى يذوب اتركه في اناء الثلج لمدة ثلاثين دقيقه ثم افصل الراسب بواسطة الطرد المركزي لترسب البروتينات الغير مرغوب فيها

١١ -انقل المحلول إلى وعاء جديد خذ منه ١و ٠ مل وقم بتخفيفه(كما في التجربة السابقة) واختبر وجود السم فيه عن طريق حقن جزء منه في فأر(وليكن هذا هو المحلول هـ)

كلما انخفض تركيز السم في المحلول كلما طالت فترة ظهور الأعراض على الفأر هذا يعنى ارتفاع تركيز السم في الراسب

مثلا إذا كان وقت ظهور الأعراض على الفئران المحقونة من الأنابيب الخمسة هو كالتالي

الأنبوب أ ٨ ساعات -------

الأنبوب ب ١٣ ساعة -----

الأنبوب ج ٢٢ ساعة -----

الأنبوب د ~~لاظهور للأعراض~~
الأنبوب هـ ~~لاظهور للأعراض~~
هذا يعنى أن السم بدا في الترسب عند تركيز ٢٠ %إلى ٤٠ %(حوالي ٣٠ %) وترسب تماما عند تركيز أعلى من ٦٠ %(حوالي ٧٠ %)
لذا فان في الأجزاء التالية من المحلول نقوم بعمل ترسيب للسم عند تركيز من ٢٠ إلى ٧٠ %

نظريا فان معظم السم سيترسب عند تركيز ٢٠ %
ملاحظات هامه
عملية الطرد المركزي والترسيب تتم في نوعين من الأنابيب
نوع زجاجي إذا كان الجزء المطلوب للعمل عليه في الخطوات التالية هو المحلول
نوع بلاستيكي ذو نهاية مدببة ~~إذا كان الجزء~~ المطلوب للعمل عليه في الخطوات التالية هو الراسب(حيث يتم قطع الجزء السفلى بسهولة)
٢ -أثناء وضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي يجب ملاحظة الاتى
١ توضع الأنابيب في صورة أزواج وليس أفراد كل أنبوبة لها أنبوبة مقابلة لها
٢ للأنابيب المتقابلة يجب أن تكون متماثلة في الوزن(لا تضع أنبوبة بها ماء مقابل أنبوبة بها محلول ملحي عالي التركيز مثلا)
٣ -الأفضل أن يقسم نفس السائل على أنبوبتين بكميات متساوية

ملاحظة هامة: -

في حالة تعذر الحصول على الامونيوم سلفات يمكن استخدام ملح الطعام العادي(NaCL)الصوديوم كلورايد وفى هذه الحالة يجب أن يتم حساب كمية الملح اللازمة لتحويل المحلول إلى محلول مشبع بتركيز ١٠٠ % عند درجة حرارة صفر مئوي كالاتى
١ لحضر أنبوبة اختبار وضع فيها ٢٠ مل ماء مقطر وضعها في الثلج قم بوزن كمية ابتدائية من الملح وضعها في الأنبوبة وقم بالتقليب
٢ استمر في إضافة كميات من الملح حتى يتوقف الملح عن الذوبان(المحلول أصبح مشبع=١٠٠ %)
مثلا إذا كانت الكمية التي تؤدى إلى تشبع ٢٠ مل =٢جم
إذا فهي بالنسبة للتر= ١٠٠ جم
يتم وضع كميات الملح تصاعديا كما في حالة الامونيوم سلفات (فمثلا بالنسبة ل ٢٠ مل تركيز ٢٠ %=٤و٠ جم)وهكذا تقريبيا
ويتم الاستمرار على نفس الخطوات بدون الاستعانة بالجدول ولكن اعتمادا على هذا الحساب التقريبي لتركيز الملح

الفصل الرابع
قياس تركيز السم الموجود في العينة
يعتمد قياس السم على سرعة ظهور أعراض المرض على فئران بعد حقنها خلال٣ أيام من الحقن
ارتعاش الفراء بطء التنفس ضعف في الأطراف يؤدى إلى شلل تام مع الوقت اللهاث -سقوط الفك السفلى ثم الموت نتيجة لتوقف الجهاز التنفسي
ملاحظة سم التيتانوس الذي تنتجة احدى أفراد هذه العائلة أيضا يسبب أعراض مشابهه(في هذه الحالة يتم التأكد عن طريق الفحص الميكروسكوبي

وفاة الفأر بدون ظهور هذه العلامات لا يعنى تواجد السم
كيفية التقدير التقريبي لكمية السم الموجودة في عينة ما بعد تنقيتها

الخطوات
١ خذ الكمية المراد معرفة مقدار السم بها وضع عليها ١٠ مل محلول ملحي أو فوسفات بفر هذا المحلول سنفرض انه يحتوى على الكمية
(س) جم من السم (أنبوب ١)
٢ خذ ١و٠ مل من المحلول وأضفه إلى ٩و٩ مل محلول ملحي (أنبوب رقم ٢)
٣ خذ ١و٠ مل من المحلول وأضفه إلى ٩و٩ مل محلول ملحي (أنبوب رقم ٣)
٤ خذ ١و٠ مل من المحلول وأضفه إلى ٩و٩ مل محلول ملحي (أنبوب رقم ٤)
٥ خذ ١و٠ مل من المحلول وأضفه إلى ٩و٩ مل محلول ملحي (أنبوب رقم ٥)
قم بإجراء الخطوات التالية على المحلول في الأنبوبين رقمي ٤ و ٥
خذ كمية ١و٠ مل ٢و٠مل ٣و٠مل ٤و٠مل ٥و٠مل من كل من الأنابيب ٤ و ٥ واحقن كل منها في فأر (بعد زيادتها إلى ٥و٠ مل بواسطة محلول ملحي) وراقب الفئران لمدة ٣ أيام وحدد وقت بداية الأعراض وزمن الوفاة لكل على حدة

تركيز السم في كمية ١و٠ مل من الأنبوب رقم ٤ =(١ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠و٠) س
تركيز السم في كمية ٢و٠ مل من الأنبوب رقم ٤ =٢ x(١ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠و٠) س
وهكذا

تركيز السم في كمية ١و٠ مل من الأنبوب رقم ٥ =(١ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠و٠) س
تركيز السم في كمية ٢و٠ مل من الأنبوب رقم ٥ =٢ x(١ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠ ٠و٠) س
وهكذا

رقم الأنبوب	الحجم	المادة التى صنع منها المحلول	كمية السم في ١و٠ مل من المحلول	كمية السم في المحلول كله	تركيز السم في المحلول
أنبوب ١	١٠ مل	اى كمية من الراسب	١٠و٠ س جم	س جم	١و٠ س جم/مل
أنبوب ٢	١٠ مل	١و٠ مل من أنبوب ١ +٩و٩ مل من محلول ملح	١٠٠٠و٠ س جم	١٠و٠ س جم	١٠٠و٠ س جم/مل
أنبوب ٣	١٠ مل	١و٠ مل من أنبوب ٢ +٩و٩ مل من محلول ملح	١٠٠٠٠٠و٠ س جم	١٠٠٠و٠ س جم	١٠٠٠٠و٠ س جم/مل
أنبوب ٤ (منه تجرى التجارب)	١٠ مل	١و٠ مل من أنبوب ٣ +٩و٩ مل من	١٠٠٠٠٠٠٠و٠ س جم	١٠٠٠٠٠و٠ س جم	١٠٠٠٠٠و٠ س جم/مل

		محلول ملح			
أنبوب ٥(منه تجرى التجارب)	١٠ مل	١و٠ مل من أنبوب ٤ +٩و٩ مل من محلول ملح	٠٠٠٠٠٠٠٠٠ ٠١و٠ س جم	٠٠٠٠٠٠٠٠ ١و٠ س جم	٠٠٠٠٠٠٠٠٠ ١و٠ س جم/مل

بعد حقن الفئران حدد اقل جرعة أظهرت أعراضا على الفئران هذه الجرعة تسمى (MLD) أو اقل الجرعات السامة وهذه الجرعة للفأر نظريا تساوى

٠٠٠٠١و٠ ميكروجرام

لذا على سبيل المثال

إذا كانت اقل جرعة سامة أدت إلى ظهور الأعراض على الفأر هي الجرعة ٣ x ٠٠٠٠٠٠٠١و٠ س جم (٣و٠ مل من الأنبوب ٤)

إذا

٣ x ٠٠٠٠٠٠٠٠١و٠ س جم= ٠٠٠٠١و٠ ميكروجرام

إذا

س= ٣٣ ميكروجرام

إذا كمية السم الموجودة في أول التجربة (في أنبوب ١)=٣٣ ميكروجرام من السم

ملاحظة

اقل الجرعات السامة للإنسان هي ١ميكروجرام لكل كجم من وزن الجسم

الفصل الخامس

تخزين السم والحفاظ على ثباته

بعد عملية الفصل والتنقية تتم عملية التجفيف للسم وهى إما أن تكون عن طريق التجفيف في درجات حرارة منخفضة(باستخدام ليوفيلايزر)

أو باستخدام الطرد المركزي تحت ضغط ودرجة حرارة منخفضتين (لكل من هاتين الوسيلتين جهاز خاص يهما يقوم بإجراء تلك العملية للحصول على الناتج النهائي في صورة بودرة مجففه خالية من الرطوبة) وعندئذ تكون اكتملت خطوات التحضير وبقي الحفاظ على ثبات السم وعدم ضياع فاعليته حيث انه

١ يفقد فاعليته نتيجة التعرض للضوء الأوكسجين الرطوبة لذا يجب أن يحفظ في أوعية محكمة الغلق داكنة اللون بها مادة ماصة للرطوبة (مثل المواد التي تكون موجودة في علب الادويه) وفي غياب الأوكسجين (باستخدام شمعة تحترق حتى نفاذ الأوكسجين أو عن طريق ضخ غاز ثاني اوكسيد الكربون بدلا عن الهواء العادي)

٢ للخليط النهائي للتنقية هو بودرة تحتوى على خليط من البروتينات (أكثرهم السم) بالإضافة إلى إنزيمات محللة قد تؤدى إلى تحلل السم في وجود الرطوبة لذا فانه يحفظ في درجة حرارة (- ٢٠)

٣ للصورة النهائية لجزيئات السم تكون على هيئة تجمعات هذه التجمعات تحافظ على ثبات السم نوعا ما

٤ -في حالة حفظ السم لفترة طويلة يفضل عمل متابعة لتركيز السم كل أسبوعين واختبار فاعليته وثباته

٥ يمكن حفظ السم في صورة محلول (وليست بودرة) في محلول ٧٠ % سلفات الامونيوم عند درجة حرارة ٤ درجات(أسهل وسيلة لحفظ السم)

٦ -إذا تمت إذابة البودرة المجففة في محلول ثم أعيد تجميد هذا المحلول ثم تسييلة مرة أخرى للاستخدام فان السم يفقد ٧٠ % من فاعليته

الفصل السادس

كيفية استخدام سم البوتيولزم كسلاح بيولوجي

تتم إذابة البودرة المنقاة في الماء (مع إضافة ١و٠ إلى ١ % من سائل منظف صابون سائل لكي تزيد من ذوبان السم) وبعد ذلك يمكن أن تستخدم في صورة رذاذ(فاعلية الرذاذ تتناسب تناسبا عكسيا مع حجم الجزيئات كلما صغر حجم الجزيئات زاد تغلغلها في الجهاز التنفسي وزادت فاعليتها

يمكن استخدام جهاز نيبيولايزر المستخدم لعلاج مرضى الربو لتكوين رذاذ يتراوح حجمه بين٥و٠ إلى ٥ ميكرون ولكن الناتج يكون بكميات قليلة
لإنتاج كميات كبيرة ستكون بحاجة إلى جهاز معقد نوعا لإنتاج جزيئات ذات حجم مناسب
(سيتم عمل بحث آخر إن شاء الله حول كيفية إنتاج الرذاذ والحفاظ عليه والعوامل التي تؤثر في الجزيئات بعد إطلاقها)

يمكن إضافة السم إلى مصادر المياه أو مصادر الغذاء
في هذه الحالة فان السم سيتم امتصاصه عن طريق الأمعاء (ملاحظة في حالة تسخين الطعام أو الماء فان السم سيفقد فاعليته)

يمكن تطوير طرق أخرى كثيرة لاستخدام السم على حسب الظروف والبيئة المحيطة

وفى نهاية هذا الشرح المتواضع اسأل الله سبحانه وتعالى أن يتقبله وان يجعله مفيدا للإسلام والمسلمين والجهاد والمجاهدين في سبيل الله في جميع أصقاع الأرض وان يستخدمه المجاهدون في مايرضى الله عز وجل من جهاد للكافرين ونكاية فيهم واننى أتبرأ إلى الله من كل من يستخدمه لهوى في نفسه أو لمصلحة شخصية أو أن يستخدم في غير الجهاد في سبيل الله لتكون كلمة الله هي العليا وكلمة الذين كفروا هي السفلى
وارجوا من كل من يقرأ هذا الشرح أو يعمل به أن يدعوا الله لصاحبة أن يرزقه الشهادة في سبيله وان يجعله مع من انعم الله عليهم مع النبيين والصديقين والشهداء وحسن أولئك رفيقا
وما كان في هذا الشرح من صواب فبفضل من الرحمن

وما كان فية من خطأ ونقص فمن نفسي والشيطان
(وَمَا أُبَرِّئُ نَفْسِي إِنَّ النَّفْسَ لَأَمَّارَةٌ بِالسُّوءِ إِلَّا مَا رَحِمَ رَبِّي إِنَّ رَبِّي غَفُورٌ رَحِيمٌ)
سبحانك اللهم وبحمدك،اشهد ان لا اله الا انت،استغفرك واتوب اليك
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
وَالْعَصْرِ (١) إِنَّ الْإِنسَانَ لَفِي خُسْرٍ (٢) إِلَّا الَّذِينَ آمَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ وَتَوَاصَوْا بِالْحَقِّ وَتَوَاصَوْا بِالصَّبْرِ (٣)